Tome 72, fascicule 1 (à la mémoire d'Emile Guyénot), n° 2. — Avril 1965

Informations complémentaires sur les sites de déphosphorylation de mononucléotides dans les œufs fixés de souris

par

Albert-M. DALCQ

Université de Bruxelles — Unité de recherches cyto-enzymologiques sur le développement

Avec 1 figure dans le texte et 3 planches

La localisation des enzymes déphosphorylant les esters phosphoriques d'adénosine, adénine, uridine, cytidine et thymidine dans les premiers stades des œufs de mammifères est réalisable par une méthode de manipulation *in toto* applicable tant que les œufs ne sont pas implantés. Cette méthode repose sur l'incubation des germes extraits des follicules, de la trompe ou de l'utérus dans un milieu tamponné contenant le mononucléotide et un métal doué d'affinité pour l'anion phosphorique à libérer. Une réaction appropriée révèle ensuite la situation des phosphates ainsi formés.

J'ai précédemment fait connaître les images ainsi observables dans les œufs de rat et de souris incubés sans fixation préalable dans un milieu alcalin en présence d'ATP et de Ca^{++} (1959), dans les œufs de souris incubés directement aussi mais en milieu presque neutre contenant divers composés d'adénosine, la captation du P inorganique libéré (Pi) se faisant par le Pb^{++} (1962b), dans les œufs des deux muridés fixés au formol puis incubés avec toute une série de mononucléotides * en milieu soit calcique (1962a) soit plom-

* Tri-, di- et monophosphates d'adénosine, adénine, inosine, cytidine uridine.

bique (1961, 1962c, 1963, 1964). J'ai pu mettre ainsi constamment en évidence des réactions localisées d'une part en surface, tant au cortex que dans les sillons de segmentation, d'autre part dans des organites des cytoplasmes et des noyaux, ces derniers posant un problème d'interprétation familier à tous les cytochimistes.

Etant parvenu, grâce à ces multiples essais, à définir les conditions optimales mettant en évidence les sites de déphosphorylation dans les œufs fixés au formol, j'ai récemment appliqué ces règles à quelques lots d'œufs de souris en m'efforçant de préciser les changements survenant lors de l'entrée en maturation, lors de la fécondation et lors de la première segmentation. Ces nouvelles mais modestes observations font l'objet de la présente contribution. Elles risquent de paraître quelque peu disparates et de comporter autant de confirmations de faits déjà établis que de précisions sur des points particuliers. La nature même de ces recherches implique de les adapter au matériel dont on dispose au jour le jour, sans pouvoir les mener sur un plan aussi logique qu'on le souhaiterait. Force est de glaner les résultats à mesure des occasions propices, et de les ordonner ensuite pour le mieux.

MATÉRIEL ET MÉTHODE

Les oocytes, œufs vierges tubaires, œufs fécondés et œufs divisés en II proviennent de 13 souris blanches de souche Swiss. Ils ont été recueillis au début de la matinée dans du Locke refroidi et fixés aussitôt dans un mélange froid de 7 p. de Locke 2 p. de H_2O et 1 p. de formol ramené à un pH compris entre 7,5 et 8,5. Après 1 à 2h à 4° C, ils ont été lavés un temps équivalent dans 50 ml de Locke également à 4° C. La détection des activités enzymatiques a alors été inspirée des indications dues à Wachstein et *alii* (1960) mais adaptées au cas des œufs de faible volume. Ceux-ci ont donc été incubés pendant quelques heures à 37° C dans un mélange comprenant du Tris au pH adopté, du $(NO_3)_2Pb$ à la concentration de 5.10^{-4} M, du $(NO_3)_2$ Mg* à la même concentration et enfin le substrat à étudier (produits Sigma, conservés au froid sec), celui-ci à la concentration finale uniforme de 10^{-3} M.

* Sauf dans les expériences S714-715.

Au bout du temps requis d'incubation, ils ont été rincés dans du Locke puis soumis à la révélation du $(PO_3)_2Pb_3$ par transformation en PbS. Pour cela, l'excès de $(NO_3)_2Pb$ subsistant dans les objets a d'abord été éliminé par double rinçage soit avec un tampon acétate au pH 4,95, soit à l'eau distillée, en prolongeant un peu ce temps. Après le traitement au $(NH_4)_2S$, les œufs ont été de nouveau rincés dans deux bains de H_2O. Le passage dans les divers milieux a été effectué par pipettages successifs jusqu'au montage dans la glycerin-jelly.

Ces manipulations, dont je compte donner d'autre part un exposé détaillé (en préparation), sont donc telles, dans les cas ici décrits, que les œufs recueillis dans la matinée peuvent être examinés dès la fin de l'après-midi. Leur étude peut ensuite être menée à loisir, les préparations « révélées » se maintenant pendant 4 à 6 mois avant la polymérisation du PbS. Leur analyse a été faite avec les meilleurs moyens de la microscopie optique tant en lumière ordinaire qu'en contraste de phase (= Cph, appareil Leitz-Heine) et en fond noir Leitz (= FN). Photographies en partie au Leica sur film Gevaert Scientia 39-C.56, mais surtout à l'Aristophot sur film Isopan Agfa.

Ont été considérés comme positifs, les sites apparaissant, en éclairage direct, en noir ou en gris très foncé. Les particules sombres visibles seulement en recourant au CPh n'auront la même valeur que si elles sont également lumineuses en FN, cas d'ailleurs fréquent. Les colorations brunes diffuses n'ont pas été prises en considération, étant au moins suspectes de rétention du $(NO_3)_2Pb$.

Le petit nombre d'œufs contenus dans chaque préparation peut paraître criticable méthodologiquement. En fait, la réaction des œufs prélevés d'un coup sur un animal est remarquablement homogène. Les exceptions, d'ailleurs rares, ne semblent dues qu'à une déficience fonctionnelle du germe. Les œufs de même âge provenant de divers animaux présentent aussi un très haut degré d'homogénéité. Une vérification statistique n'a donc pas paru nécessaire jusqu'ici.

Ces recherches ont bénéficié d'un crédit gouvernemental consacré à l'Enzymologie médicale. Les expériences ont été effectuées avec soin et habileté par M. Roger Huyghens, technicien. Pour les observations et photographies, j'ai disposé de l'aide attentive de Mlle J. Wolvekamp. Je les en remercie.

OBSERVATIONS PERSONNELLES

Dans mes diverses publications antérieures sur cette question, j'ai déjà fait connaître les aspects remarquables que fait apparaître la détection des enzymes déphosphorylant toute une série d'esters phosphoriques. J'ai mis aussi en évidence les modalités de l'activation et de l'inhibition. J'ai ainsi reconnu comme sites enzymatiques microscopiquement perceptibles: 1) les surfaces cellulaires, dans lesquelles il faut distinguer le cortex général et les sillons formés au cours des mitoses de maturation ou de segmentation, ainsi que les zones de contact entre les blastomères; 2) des organites du cytoplasme qui sont d'une part les granules mitochondriaux, pour autant que leur activité résiste à la formolisation, et d'autre part des corpuscules de densité relative moins forte, plus volumineux, souvent réunis en petits groupes ou en amas éventuellement considérables, avec des aspects évoluant de stade en stade, et que j'ai appelé déphosphosomes (= DPS); 3) des sphérules incluses dans les nucléoles et des croûtelles ou verrues posées sur la surface de ceux-ci, et dont le caractère enzymatique semble, malgré tout, pouvoir être admis. Ces diverses manifestations conservent, quel que soit le tri- ou diphosphate utilisé, un remarquable caractère d'uniformité, bien qu'il ne faille pas exclure des spécificités de détail qui ont pu échapper. L'importance de ces constatations ressort de leur rencontre chez les deux espèces explorées, de différences appréciables qui caractérisent cependant chacune de ces espèces, des modifications que ce tableau enzymatique offre au cours du développement, en particulier du changement subit qui peut être mis en évidence lors de la fécondation. Les compléments qui vont être apportés à certaines de ces notions portent seulement sur une phase initiale très limitée, sans dépasser, à une exception près (S. 715), le stade à deux blastomères et ne concernent guère que six lots d'œufs provenant de 13 animaux. Pour chacun d'eux, une expérience *sui generis* a été instituée. Il suffira d'en donner la relation et il sera nécessaire que celle-ci soit détaillée, afin que l'interprétation donnée dans chaque cas soit suffisamment justifiée.

Les préoccupations majeures ont été de serrer quelque peu le facteur pH, de voir si l'entrée en maturation retentit sur les activités enzymatiques étudiées, et encore d'examiner si les esters de la

thymidine auraient un comportement spécial. Et il y a eu, par surcroît, l'imprévu de chaque expérience. En abordant la description des expériences, rappelons que la concentration des substrats a été uniformément de 10^{-3} M.

S 700. Une ♀ non-fécondée livre 9 œufs « vierges et mûrs » groupés en amas dans une dilatation initiale de chaque oviducte. Ils sont libérés par l'hyaluronidase puis fixés, tandis qu'une vingtaine d'oocytes sont recueillis par dilacération des ovaires, après élimination mécanique de leurs cellules folliculeuses. Après fixation (1 h 30 min) et lavage (1 h), ces objets sont incubés (2 h) comparativement dans les diphosphates d'adénine (ADP), d'inosine (IDP), et d'uridine (UDP) au pH 7,2. Révélation standard sous forme de PbS.

Dans les trois milieux, les oocytes pourvus de leur vésicule germinative ont réagi plus faiblement que les œufs vierges tubaires. Le cytoplasme des premiers contient un semis de DPS isolés où s'interposent des amas peu fournis de ces éléments (fig. 1). Les oocytes de 2e ordre ont leur cytoplasme obscurci par de nombreux amas entremêlés de grains isolés, l'ensemble manifestant, sous l'angle favorable, une tendance à la symétrisation (fig. 2). S'il se trouve dans les lots ovariens des oocytes entrés en maturation, leur réaction est également intensifiée.

L'UDP a un effet quelque peu différent des autres substrats. Dans les oocytes au repos, il n'y a pas ou peu d'amas de DPS, tandis que le chorion est fortement imprégné. De même, dans les œufs tubaires, la réaction interne est moins forte, mais la périphérie couverte de PbS précipité. L'enzyme a donc diffusé malgré la fixation préalable, fait que j'ai déjà eu l'occasion d'enregistrer dans d'autres circonstances.

A côté de cette confirmation intéressante, et apparemment révélatrice de spécificité, l'enseignement essentiel de cette expérience est que l'entrée en maturation comporte soit une activation, soit un renforcement du système enzymatique étudié. Il n'y a pas jusqu'ici de signe qu'il s'agisse d'un phénomène progressif.

S 710 et S 711. Un même matin sont recueillis 20 oocytes ovariens, 10 œufs fécondés indivis et 8 œufs en II, fécondés de la veille. Après fixation (1 h) et lavage (1 h), ils sont répartis en 6 lots

qui sont incubés (4 h) à 37° en présence d'ATP ou d'ADP sans Mg^{++}, aux pH respectifs de 5.8, 6.3, 6.8 (ATP seul) et 7.5 (ADP seul). Révélation standard. Les examens sont uniquement faits en lumière ordinaire.

Au *pH 5.8*, après ATP, tout serait négatif s'il n'existait, au stade II, dans le sillon interblastomérique, une petite poche positive; on surprend donc là le début de la réaction sulcale. Après ADP, tout est négatif, sauf quelques DPS dispersés dans deux des oocytes.

Au *pH 6.3*, la réaction est générale et riche de détails intéressants.

Après ATP, les oocytes sont discrètement positifs (voir fig. 1), avec des DPS dont les uns sont isolés, les autres en amas formant balle, ceux-ci se manifestant de préférence à la périphérie. Dans les œufs fécondés, la réaction dépasse sensiblement le niveau de la fig. 2. Bien observable dans les fig. 3 et 4, elle montre la majorité des balles de grains à la périphérie; dans les deux cas, la répartition n'est nullement affectée par la polarité, mais paraît symétrisée. Dans les deux œufs, la réaction sulcale se manifeste au niveau du ou des globules polaires, qui eux-mêmes contiennent des DPS. Au stade II (fig. 5) la réaction, toutes conditions strictement égales, est sensiblement réduite par rapport aux œufs fécondés. Elle est, dans le cas présenté, plus forte dans l'un des deux blastomères; cette disposition, d'ailleurs souvent observée, répond vraisemblablement à une segmentation perpendiculaire au plan de symétrie. Les amas restent à prédominance nettement périphérique. Le PbS comble tout le sillon en formant un amas continu mais à surface mamelonnée. Rien de nucléaire n'a été aperçu, mais en l'absence d'examen en FN, on ne peut être formel.

Après ADP, les relations générales sont du même type, mais sensiblement plus modérées, sauf que, dans un stade II, la réaction sulcale surpasse remarquablement le degré montré par la fig. 5.

Au *pH 6.8*, où l'ATP a été seul utilisé, toutes les réactions sont accentuées, le stade I étant nettement prédominant. Pour autant que la différence de forme permette la comparaison, les stades II sont plutôt en retrait sur les oocytes. Par ailleurs, la réaction sulcale n'est pas renforcée, ce qui indique que son optimum se situe du côté acide. L'activité sulcale pointait en effet dès le pH 5.8.

Au *pH 7.5*, scruté en présence d'ADP, le seuil d'efficacité est dépassé, car les spécimens sont bourrés de PbS jusqu'à l'opacité intégrale.

Cette expérience confirme donc que le pouvoir de déphosphorylation des œufs fixés est plus fort dans l'œuf fécondé indivis qu'il ne le sera après sa première division, et aussi plus fort qu'il ne l'était dans l'oocyte au repos. L'activité de l'œuf fécondé prime aussi, comme je l'ai vu d'autre part, sur celle de l'œuf « vierge et mûr ». La réaction du cytoplasme s'accentue à mesure que le milieu évolue vers l'alcalinité. La déphosphorylation au niveau du premier sillon paraît avoir son optimum du côté acide, probablement vers 6.5. Ajoutons encore que les balles de DPS se manifestent plus à proximité du plasmolemme que du noyau.

S 714-715. L'expérience porte cette fois sur 20 oocytes, 9 œufs fécondés indivis et 7 œufs en IV et VIII, dont il ne sera guère question. Elle est calquée sur la précédente, ou peu s'en faut: 1 h de fixation, 45 min de lavage, 3 h 45 min d'incubation, en comparant, sans activateur, ATP et ADP aux pH de 6.3, 6.8 et 7.5. Un lot témoin est resté parfaitement négatif.

Après ATP au *pH 6.3*, la réaction est, contrairement au cas précédent, à peine esquissée. Après l'ADP, les oocytes au repos restent pratiquement négatifs, mais les œufs en maturation, fécondés ou non, sont modérément positifs. L'un d'eux montre un fuseau de maturation (fig. 6) dont les fibres paraissent bien avoir réagi, surtout dans leur partie polaire, nantie de très fines granulations.

Au *pH 6.8*, la préparation du lot incubé dans l'ATP ne contient que 3 oocytes, avec la réaction typique déjà décrite ici, tandis que le lot incubé dans l'ADP montre un bel exemple de pénétration du spermatozoïde, avec réaction nette au point de pénétration. La même préparation contient également un stade IV ayant fortement réagi, mais d'une façon inégale selon les blastomères.

Au *pH 7.5*, on peut à nouveau comparer les effets d'une incubation dans l'ATP sur des oocytes, les œufs fécondés et des stades VIII. Le niveau de leurs réactions répond aux prévisions, l'intensité la plus grande étant atteinte au 3e cycle des mitoses. Néanmoins, un œuf indivis n'a qu'une réaction très modérée, ce qui s'explique du fait qu'il vient d'être fécondé. L'image est particulièrement intéressante du fait que tout le spermatozoïde se présente dans un même plan optique (fig. 7). Le flagelle est encore en partie à l'extérieur du plasmolemme, où il s'incurve en boucle. Après un trajet

presque rectiligne suivi d'une angulation brève, une réaction nette marque le passage à la pièce intermédiaire. Celle-ci est d'abord repliée en V, comme si la spermie avait rencontré une résistance, puis le trajet se prolonge sans incident notable jusqu'à la base du noyau. Autour de celui-ci se présente une coque ajourée, formée de DPS à réaction vive. En cela, l'observation ne fait qu'en confirmer plusieurs autres, déjà signalées en 1962.

Un lot incubé dans ADP à ce pH légèrement alcalin avait été prévu, mais un incident technique m'en a privé.

Cette expérience confirme donc le rôle essentiel du pH, tout en indiquant qu'il peut y avoir, d'une ponte à l'autre, certaines différences de réactivité. Elle suggère une activité déphosphorylante dans les fibres d'un fuseau de maturation, et ce n'est pas le seul cas où j'aie soupçonné cette localisation, sans toutefois pouvoir retrouver ces indices dans les mitoses de segmentation. Enfin, l'expérience apporte un nouvel argument en faveur d'une activation très rapide des DPS entourant le noyau spermatique tout récemment pénétré.

S 729-730. L'objectif a été ici d'explorer la déphosphorylation des tri- et diphosphates de thymidine (TTP et DTP) et de la comparer simultanément à celle de l'ATP et de l'ADP.

Deux ♀, chez lesquelles un bouchon vaginal vient d'être observé le matin, me procurent 18 œufs fécondés et autant d'oocytes qui sont fixés (environ 1 h) lavés (id.) et répartis en quatre groupes. Ceux-ci sont incubés à 32° C dans le Tris-Pb-Mg au pH 6.8 additionné respectivement de TTP, TDP, ATP et ADP. Afin de bien surprendre la phase terminale de la réaction, un lot (nécessairement petit!) de chaque groupe voit son incubation limitée à 2 h 30, le second à 3 h 30, aux quelques minutes près que requiert la mise en train de la révélation.

Une première lecture, immédiate, mais malheureusement peu approfondie, donne lieu aux notations suivantes.

TTP: a) lot de 2 h 30. Oocytes à nombreux DPS; œufs fécondés opaques. *b)* lot de 3 h 30 = plus lisible. Un beau stade pronucléi, farci de DPS dont un amas sphérique particulièrement volumineux, et que nous retrouverons plus bas.

TDP, lot a: œuf fécondé farci de DPS, mais sans amas; lot b: une balle de grains positifs se manifeste.

ATP, lot a: allure semblable au même lot de TDP; lot b: réaction accentuée, avec la mention « beau », mais un incident a supprimé cette préparation.

ADP: les différences habituelles s'observent entre oocytes et œufs fécondés.

La seule différence apparemment attribuable au substrat est donc la mise en évidence plus aisée, avec les esters de la thymidine, d'une ou plusieurs balles de DPS localisées en périphérie.

Près de quatre mois se sont écoulés avant qu'une étude plus minutieuse de ces préparations puisse être reprise. Fort heureusement, leur seule modification n'était encore qu'une légère atténuation de la réaction, devenue lisible dans ceux des œufs fécondés où elle ne l'était pas initialement. Le dispositif Heine a été utilisé de façon à surprendre en Cph le maximum de détails, à condition que leur relation avec la libération de Pi s'impose par leur luminosité en FN.

TTP. Pour le lot incubé 2 h 30, comparons un oocyte (fig. 8) et deux œufs fécondés (fig. 9 et 10). En lumière directe, l'oocyte semble *devenu* pratiquement négatif (fig. 8a). Au Cph, son cytoplasme apparaît chargé de nuages sombres à divers degrés dans lesquels se détachent, surtout près du noyau des granules positifs, la plupart du temps accompagnés d'une vésicule claire (fig. 8b). La tache germinative présente une hétérogénéité certaine, mais qui aurait requis, sur la préparation non vieillie, un examen attentif au FN. Des deux œufs fécondés, l'un est nanti de son globule polaire, dont l'expulsion a déterminé une forte réaction sulcale visible au niveau optique de la fig. 9a, mais pas en 9b. Dans ces deux œufs, le cytoplasme contient un semis de DPS bien noirs, de diamètre allant du juste visible à 1.5 μ, entremêlés d'amas d'importance diverse. Dans chaque œuf, il existe une masse sphérique exceptionnellement volumineuse, d'un diamètre de 4 à 6 μ. Les grains positifs sont arrangés autour d'une zone claire qui peut être simple (fig. 9a) ou double (fig. 10a). Au Cph, (fig. 9b et 10b) la structure générale est hétérogène, avec des nuages plus petits et plus denses que dans l'oocyte, et dont l'ensemble est lactescent en FN. En Cph encore, des points plus sombres marquent les granules positifs, la tache claire du gros amas se résoud en plusieurs vésicules. Dans le second œuf, je n'ai pas réussi à découvrir la mitose de maturation, probablement encore présente.

Après une incubation prolongée encore d'une heure, la réaction des oocytes reste, comme prévu, nettement en retrait sur celle des œufs fécondés (fig. 11). Dans le cas le plus accentué, un oocyte montrait un semis assez abondant de DPS et plusieurs amas globuleux au voisinage de sa vésicule germinative (fig. 12a). Le Cph montre bien ces amas, d'autres plus petits, qui auraient échappé en éclairage ordinaire, et les granules positifs isolés (fig. 12b). Ceux-ci sont systématiquement accolés à une vésicule. Le fond du cytoplasme est hétérogène, moins cependant qu'après une incubation plus courte et cela se traduit en FN (fig. 12c) par un aspect laiteux. Le nucléole n'est pas totalement négatif. Des deux œufs fécondés présents, l'un n'avait pas de globule polaire et avait réagi assez modérément, avec, cependant, deux amas globuleux, proches du cortex. L'autre œuf a réalisé sa maturation et présente, au complet le tableau du stade à jeunes pronucléi. De nombreux amas (fig. 13 a et b) de granules sont répartis dans tout le cytoplasme, mais le plus imposant est logé très près du globule polaire. Dans les mêmes conditions que pour la fig. 12d, la charge d'éléments lumineux en FN est poussée au maximum (fig. 13b).

TDP. Le lot incubé 2 h 30 comprend 5 oocytes et 2 œufs fécondés. Dans les oocytes, le cortex est garni de DPS espacés et volumineux, moins nombreux qu'après le TTP. Le cytoplasme contient des grains fins, espacés, que le Cph révèle nombreux. Le FN obtenu avec le Heine ne donne pas d'aspect lactescent, mais le vrai dispositif FN, plus puissant, n'a pas été utilisé dans ce cas. Le nucléole, parfois dédoublé, de ces oocytes est régulièrement garni à sa surface de grains surélevés, parfois de tractus. Dans une vésicule germinative à deux nucléoles, je dénombre sur ceux-ci une quarantaine de ces éminences hémisphériques. Dans les deux œufs fécondés, la réaction du cytoplasme se borne à des DPS plus petits que dans les oocytes, et qui produisent en FN un aspect nettement laiteux. On peut observer une pénétration du spermatozoïde, avec un peu de réaction locale des DPS.

Le lot incubé 1 h de plus dans le même substrat comprend 3 œufs fécondés présentant une réaction granulaire délicate évoquant celle de la fig. 13a, mais sensiblement atténuée. C'est l'association habituelle de menues vésicules et de grains noirs juxtaposés, grains lumineux en FN. Je n'ai pu découvrir ni mitose de maturation ni pronucléi.

ATP. La préparation étudiée (2 h 30 d'incubation) contient 2 oocytes et 2 œufs fécondés. La description des oocytes retrouve le cas du TDP, sauf l'absence de tout signe nucléolaire. La réaction des deux œufs fécondés peut être appréciée d'après les fig. 14a et b. Il s'agit, comme on le constatera, d'une texture bien différente de celle obtenue par le TTP. Ce sont encore une fois de nombreux granules, la plupart isolés mais beaucoup groupés, tous lumineux en FN. On n'aperçoit aucune de ces masses globuleuses observées par ailleurs. Cet œuf avait expulsé son 2[d] globule polaire, respon-

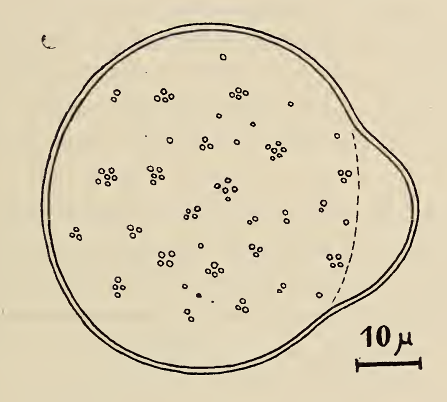


Fig. I.
S 729-30 — Œuf fécondé incubé dans ATP au stade de la protubérance Absence de DPS dans celle-ci.

sable de la protubérance visible en clair vers le haut. On peut découvrir à proximité de ce pôle le jeune pronucléus ♀, tandis que le pronucléus ♂ est également en périphérie, presque à l'autre pôle. Ces pronucléi, situés aussi hors du plan optique de la photographie, ne contiennent encore que 2 petits nucléoles primaires, sans apparence d'activité enzymatique. L'autre œuf a été surpris plus jeune encore; il présente la protubérance de fécondation, remarquable par son aspect clair, contrastant avec le cytoplasme tout occupé par les DPS (fig. I).

ADP. Les deux préparations contiennent des oocytes et des œufs fécondés qui ne présentent rien d'imprévu. Leur réaction est généralement en retrait sur celle provoquée par l'ATP, et à plus forte raison sur les composés de thymidine. La prolongation du temps d'incubation a naturellement un effet très net.

L'enseignement de cette expérience est que les œufs fixés de souris contiennent un système enzymatique hydrolysant les esters de la thymidine d'une manière qui est, dans son allure générale, analogue à celle des autres esters déjà étudiés, mais qui s'en distingue cependant par quelques détails. La réaction est en effet singulièrement plus fournie qu'avec l'ATP et met en évidence des complexes inusités. A cela paraît s'ajouter, pour le TDP, une activité au moins possible du ou des nucléole(s) dans les oocytes.

S 727-8. Les complexes génitaux de deux ♀, l'une fécondée de la veille et l'autre le jour même, sont soumis à une centrifugation de 20 min à 25 000 g, en milieu refroidi à 6° C. La dissection fournit 17 oocytes, 9 œufs fécondés indivis et 19 stades II. Après fixation (1 h) et lavage (1 h) ils sont incubés par demi-lots pendant 3 h et 3 h 30 min, à 38°, dans le mélange Tris-Pb-Mg au pH 6.8 avec comme substrat TTP, TDP et ATP. Ces conditions sont en somme identiques à celles de l'expérience qui vient d'être relatée.

La constatation la plus évidente est, une fois de plus, que la réaction globale des œufs indivis surpasse de loin celle des stades II (fig. 15 et 16). C'est aussi que la réaction au 1er sillon n'est pas affectée par la centrifugation. Il arrive que la masse sulcale de PbS soit déportée d'un côté, mais cela ne correspond pas à une région de tassement granulaire dans le cytoplasme. Le tassement est d'ailleurs moins accentué dans cette expérience que dans d'autres similaires, mais cela ne tient pas à la nature des substrats. En somme, leur effet est uniforme, un peu moins marqué, comme toujours, après le diphosphate. Dans les deux exemples démontrés ici, respectivement pour le TTP (fig. 17a) et pour l'ATP (fig. 17b), la sédimentation a été plus nette dans le premier cas que dans le second. Le cortex est, aux stades I et II, copieusement garni de DPS volumineux, très positifs, individualisés.

Un oocyte tout récemment entré en maturation et incubé dans l'ATP m'a donné l'occasion de surprendre des détails de structure assez remarquables (fig. 18). En surface, le chorion vu à plat présentait une sorte de damier dû aux empreintes ramifiées des cellules coronales. On en voit deux exemples signalés d'une flèche à gauche de la fig. 18a. Sur la convexité du cytoplasme, on observe des taches ovalaires, amas de petits grains positifs, et des grains individuels très menus, épars. Plus profondément, sur le plan du

nucléole (fig. 18b) et en dessous de lui (fig. 18c), les amas ovoïdes du cortex sont remplacés par une sorte de feutrage avec quelques blocs irréguliers. La tache germinative est quelque peu hétérogène.

L'apport de cette expérience est assez maigre, sauf en tant que généralisation de certaines modalités réactionnelles et observations de détail sur la structure. Il était cependant nécessaire de s'assurer que le TTP et le TDP ne révèlent rien d'imprévu dans les œufs centrifugés.

S 731 à 734. Cette dernière expérience a spécialement visé à comparer les effets d'une incubation des stades II dans TTP, TDP, ATP, ADP à 3 pH différents. Pour permettre l'échelonnement des manipulations, il a fallu adopter pour chaque pH un temps d'incubation différent, le pH le plus acide bénéficiant de l'incubation la plus longue.

4♀ fécondées la veille ont fourni 46 stades II qui ont été d'abord, pendant les récoltes successives, conservés dans du Locke à +5° C avant d'être fixés (50 min), lavés (45 min) puis mis en incubation à 37° C dans le tris-Pb-Mg+substrat suivant le plan que voici:

	pH 6.3 pendant 3 h 30 min	pH 6.8 pendant 3 h	pH 7.5 pendant 2 h 30 min
TTP	a 1	b 1	c 1
TDP	a 2	b 2	c 2
ATP	a 3	b 3	c 3
ADP	a 4	b 4	c 4

Chaque lot de 4 œufs (3 seulement en c 2, b 4 et c 3) a été rincé dans deux bains de H_2O et soumis à la révélation standard au $(NH_4)_2S$. Les préparations ont fait l'objet d'une inspection immédiate et d'un examen complet dans les journées suivantes:

1) *TTP* = en a1, le cytoplasme est constellé de DPS isolés, les noyaux sont négatifs, une forte réaction sulcale s'est produite. Tantôt, elle dessine une lentille régulière entre les deux blastomères (fig. 19), tantôt, elle s'est portée d'un côté, par une sorte d'écoulement (fig. 20). En b 1, la réaction n'intéresse ni le noyau, ni le sillon. Elle se borne à un semis modéré de DPS.

En c 1, la réaction cytoplasmique dépasse nettement le niveau de a 1 (fig. 21a, b et c), un amas globuleux de DPS se manifeste dans un cas (fig. 21b), les noyaux interviennent légèrement (fig. 21c),

la réaction sulcale est tantôt faible (a) tantôt modérée (b et c) sans atteindre le niveau observé dans a.

2) *TDP* = en a 2, les blastomères, bien ovoïdes, de chaque œuf sont nettement séparés. Le sillon est libre de toute réaction, mais dans un cas on y perçoit nettement un feutrage de filaments. La réaction se borne à des granules cytoplasmiques peu nombreux.

En b 2, les blastomères sont presque restés au contact l'un de l'autre, l'espace étant occupé par un précipité qui a eu parfois tendance à s'écouler d'un côté.

En c 2, (fig. 22), les blastomères des 3 œufs sont juste au contact ou presque, avec une trace de réaction sulcale. Souvent, le cytoplasme bordant le sillon forme une plaque plus dense. La liaison des blastomères est assurée surtout par la pièce intermédiaire du spermatozoïde laquelle est entourée d'un amas mucoïde partiellement positif. Les nucléoles sont négatifs, même en FN. Le cytoplasme présente une sorte de couronne d'ectoplasme plus dense, et cette zone est plus riche en DPS que la région périnucléaire.

3) *ATP* = en a 3, la réaction est assez proche de a 1. En b 3, dans 3 des 4 œufs, une réaction sulcale existe dans la zone de contact. Dans le 4e, il y a contact, mais sans réaction.

En c 3, les 3 œufs ont réagi très sensiblement comme dans c 1, à la différence que les cytoplasmes donnent l'impression d'une « contraction » et qu'il n'est apparu aucun gros amas de DPS.

4) *ADP* = en a 4, le tableau n'est pas strictement comparable à ce qu'il était dans a 2. La réaction est plus corsée, tant au point de vue sulcal que cytoplasmique.

En b 4, la réaction, tout en étant plus faible que dans a 4, dépasse nettement celle de b 2.

En c 4, les blastomères sont mieux accolés que dans c 2, et par ailleurs, la réaction est moins marquée que dans c 3.

Les résultats de cette expérience sont fonction des trois variables introduites: durée d'incubation, pH, nature du substrat. Les deux premiers facteurs ont donné lieu, dans les conditions que j'avais cru bon de choisir, à un jeu de compensations. Au pH bas, la prolongation de l'incubation a compensé l'effet frénateur de l'acidité. Au pH le plus élevé, l'effet favorable de l'alcalinité a été modéré par l'incubation plus courte. Au pH moyen, presque neutre, le temps accordé n'a pas permis une réaction bien caractéristique.

Il est clair que l'élévation du pH et la prolongation de l'incubation agissent dans le sens d'un renforcement général. Toutefois, une dissociation s'amorce entre la réaction sulcale et l'activité générale du cytoplasme, la première pouvant encore s'exprimer pleinement en milieu modérément acide. Quant au rôle de la nature du substrat, les différences ne sont pas très marquées, mais elles ne peuvent cependant être tenues pour inexistantes. D'une part, le triphosphate de thymidine se montre, par certains détails, plus actif que celui d'adénine. D'autre part, l'inverse tend à se produire pour les diphosphates. Il s'agit toutefois de nuances plus quantitatives que qualitatives.

DISCUSSION

Ces observations viennent compléter, pour l'œuf de souris, le tableau des activités de déphosphorylation pour des stades limités, mais particulièrement importants, allant de l'oocyte pleinement formé à l'œuf divisé en ses deux premiers blastomères. Elles confirment qu'il existe dès lors dans le germe des enzymes résistant à la fixation au formol et qui hydrolysent relativement bien, en divers sites, les tri- et diphosphates des six mononucléotides essayés jusqu'à présent. A ceux de l'adénosine, de l'adénine, de l'inosine, de la cytidine et de l'uridine, déjà étudiés précédemment, sont venus s'ajouter ici ceux de la thymidine. Pour tous, des signes microscopiques de la déphosphorylation sont obtenus dans des conditions apparemment uniformes de concentration, de température et de pH. Le rôle des activateurs n'a pas été réexaminé au cours de ces nouvelles expériences, mais ce qui en a été vu précédemment paraît également s'appliquer aux divers substrats. De plus, la présence de Pi est toujours constatée dans les mêmes constituants cellulaires, à la fois en surface et en profondeur. Tous les substrats mis à l'épreuve semblent ainsi être attaqués de la même manière, et il est constant, notamment, que l'intensité de la réaction soit plus forte avec les tri- qu'avec les diphosphates. Il semble donc bien s'agir d'enzyme(s) scindant les deux liaisons anhydrides, ou peut-être une seule de celles-ci, la plus voisine de la liaison ester.

L'allure générale du phénomène est donc celle d'une absence de spécificité vis-à-vis du nucléoside compris dans le substrat.

Cependant, une certaine réserve s'impose avant d'admettre qu'il s'agisse formellement d'une phosphohydrolase non-spécifique. En effet, si l'on compare les divers mononucléotides aux composés de l'adénosine pris comme référence, on relève souvent des différences dans l'intensité de la réaction, surtout au point de vue interne. Tel a été nettement le cas dans mes observations antérieures sur les œufs non-fixés de souris (cf. Dalcq 1962b, p. 434 *seq.*). Dans la partie vraiment nouvelle de la présente contribution, celle concernant l'exploration des composés de la thymidine, ceux-ci ont paru chaque fois, sur les mêmes œufs et dans des conditions aussi identiques que possible, avoir été hydrolysés plus énergiquement que ceux de l'adénosine employés concurremment dans les mêmes expériences. Il serait à la rigueur possible que le cytoplasme contienne un mélange de granulations douées d'une spécificité rigoureuse ou relative, mais cela paraît peu vraisemblable, vu la similitude qualitative entre les aspects observés tant pour les œufs normaux que pour les œufs centrifugés. D'autre part, on ne peut sans doute exclure que, malgré la fixation, la pénétration des divers substrats ne soit pas rigoureusement égale, ce qui rendrait compte des différences d'intensité. Il convient donc de réserver toute conclusion formelle quant à des spécificités possibles. Par ailleurs, il faut souligner que si la présomption est en faveur d'une phosphohydrolase non-spécifique assez largement répandue dans les cellules ovulaires, il serait exagéré d'y voir une simple phosphatase non-spécifique. Les comparaisons auxquelles j'ai procédé avec les incubations en présence de glycérophosphate me permettent d'être formel à cet égard. Que ce soit en milieu nettement alcalin, sensiblement neutre ou formellement acide, ce substrat n'est pas hydrolysé aux mêmes sites que les mononucléotides. A considérer spécialement la gamme acide des pH, surtout employée dans les expériences décrites ici, on ne peut déceler la phosphatase acide au niveau des sillons de segmentation, et, au sein de cytoplasme, elle n'intéresse qu'une partie des granules assimilables aux DPS (voir Dalcq, 1963, p. 249, et mémoire en préparation).

Jusqu'ici, pareilles investigations cyto-enzymologiques sur les stades très précoces du développement restent assez isolées. Dans le domaine histochimique, on voit apparaître des données relativement comparables. On a notamment décrit dans la peau humaine la déphosphorylation de l'ATP dans la membrane des mélanocytes

et dans les mélanosomes, et cette localisation extra-mitochondriale d'une ATP-ase — dont la spécificité n'a pas été scrutée — résiste à la fixation au formol (Bradshaw et alii, 1963). De même, dans le tissu nerveux examiné au microscope électronique, après fixation par certaines aldéhydes, Torack et Barnett (1963) ont pu déceler l'hydrolyse de l'ATP et de l'ADP sur la membrane des neurones, celle de l'IDP, du CTP et du GTP dans les éléments golgiens. Ici encore, on hésite entre la pluralité des enzymes et leur absence de spécificité. Dans des cellules nerveuses également, Tewari et Bourne (1963), se limitant à l'ATP, signalent la libération du Pi dans les membranes cellulaires et le réticulum endoplasmique. Dans le pancréas du lapin, Barden et Lazarus (1963) ont reconnu, par l'emploi d'inhibiteurs divers et en comparant les divers sites de déphosphorylation, la présence de « polyphosphatases » qui sont topographiquement distinctes des phosphatases alcalines et ne sont pas sans analogie, semble-t-il, avec les enzymes déphosphorylantes à large spectre que je m'efforce d'analyser dans les œufs de muridés. Il est donc indubitable qu'il existe en dehors des mitochondries, où l'on admet l'existence d'ATP-ase spécifique, tout un système d'autres enzymes déphosphorylantes dont l'exploration est à peine commencée.

Pour en revenir à l'objet de la présente contribution, limitée aux très jeunes stades fixés au formol, je devrais discuter d'abord le rôle physiologique des enzymes mises en évidence dans ces conditions, mais je réserverai cette préoccupation pour un autre mémoire (1964) et me bornerai présentement à quelques considérations cytologiques. Elles porteront nécessairement sur les membranes, les particules cytoplasmiques et les activités nucléaires.

Pour les membranes, les documents apportés ici ont un double aspect, positif et négatif. Le fait positif est que la réaction sulcale se manifeste dès le pH 6.3 et atteint une ampleur considérable dans ces conditions d'acidité. Sans doute s'accentuera-t-elle encore aux pH supérieurs, mais des observations relatées ailleurs montrent que la réaction sulcale ne s'amplifiera pas au-delà d'une certaine limite, tandis que celle des constituants cytoplasmiques gagnera rapidement jusqu'à l'opacité intégrale, dont le stade I a donné plus haut des exemples. C'est là une constatation importante car elle démontre que l'enzyme sulcale doit être différente, au moins au point de vue de sa sensibilité au pH, de celle des DPS.

On aurait pu penser que l'activité survenant dans les sillons dépendait d'une diffusion d'enzyme contenue dans les DPS situés à ce niveau, immédiatement sous le plasmolemme du sillon. Il ne paraît pas en être ainsi, tout d'abord parce que cela supposerait au moins un certain remaniement de la molécule protéique, et aussi parce que, dans la dernière expérience relatée, je n'ai pu, malgré l'observation la plus attentive, découvrir le moindre indice favorable à cette hypothèse. De plus, si la réaction sulcale dépendait des DPS, elle serait affectée par la centrifugation, ce qui n'est pas le cas (fig. 15 et 16). Il s'agit donc, selon toute vraisemblance, d'une activité nouvelle propre au plasmolemme néoformé au niveau du sillon et mes observations antérieures sur des œufs longuement fixés et lavés m'ont appris que l'enzyme apparaissant à ce niveau est très résistante au formol, ce qui l'individualise davantage.

Le fait négatif est que, dans les résultats décrits ici, la réaction corticale ne s'est jamais manifestée. Son absence s'explique de deux manières. D'une part, cette réaction du cortex non-sulcal requiert une concentration de substrat plus forte, d'autre part, elle a pour activateur principal le Ca^{++}, non présent dans les milieux utilisés. J'ai déjà montré (1962c) que ces deux enzymes sont également différentes.

En ce qui concerne les particules cytoplasmiques réagissant positivement, il faut surtout souligner la similitude avec les aspects obtenus précédemment avec les autres mononucléotides. Les quelques documents déjà publiés à ce sujet (Dalcq 1962c, 1963) seront bientôt complétés dans un autre mémoire.

Le point essentiel est que ces granules sont peut-être, en partie, des mitochondries, mais sont sûrement, pour la plus large part, d'autres éléments que j'ai qualifiés de déphosphosomes. D'une manière générale, l'activité déphosphorylante des mitochondries ovulaires est inhibée par le formol, mais il peut en subsister un reliquat donnant lieu à un fin piqueté. Les DPS ne s'en distinguent pas seulement par leur volume, leur densité relative et leur résistance à la formolisation, mais aussi par leur aptitude à former des amas globuleux à structure particulière dont divers exemples ont été décrits ici. Ces amas ne réagissent pas aussi facilement que les DPS isolés. Ils demandent un pH voisin de la neutralité, ou de préférence la dépassant, une concentration suffisante, une

incubation assez prolongée. Leur richesse relative en enzyme paraît inférieure à celle des autres DPS, d'où leur seuil plus élevé. C'est dans l'œuf fécondé qu'on les met le plus aisément en évidence, mais ils existent aussi, moins actifs, dans l'oocyte et aux stades II et IV. Leurs propriétés et leur rôle seront discutés davantage dans le mémoire en préparation. J'ai exposé récemment (1963) les arguments plaidant en faveur de l'idée que les DPS correspondent à des groupes plus ou moins considérables de corps multivésiculaires.

Qu'il s'agisse soit des DPS isolés ou en petits groupes, soit de ces amas considérables, des différences quant à l'abondance et à l'activité de ces éléments s'observent entre divers stades. J'ai déjà signalé ailleurs (Dalcq, 1962c et 1963) le rôle que joue la fécondation et la manière dont la réaction s'éveille au niveau de DPS immédiatement voisins du futur pronucléus ♂. J'ai eu l'occasion d'en donner ici un nouvel exemple, rencontré après incubation dans l'ATP. Une orientation exceptionnellement favorable montre bien le caractère récent de la fécondation, et la localisation exactement périnucléaire des corpuscules actifs.

Une étape m'avait échappé jusqu'ici. Il ne m'avait pas été donné d'établir si l'œuf prêt à être fécondé avait un équipement enzymatique supérieur à celui de l'oocyte. La première observation ici décrite (fig. 1 et 2) a tranché positivement ce point incertain. Le commentaire de ces phénomènes essentiels sera repris dans un cadre plus général.

Quant aux noyaux, ils sont, dans ces expériences, restés pratiquement négatifs et l'on serait tenté d'en conclure à l'absence d'enzyme à leur niveau. Cependant, j'ai signalé ci-dessus, sans en donner l'illustration, dans les oocytes de S 729-30 soumis au TDP, la présence de granules positifs émaillant la surface de la tache germinative. Ce détail ne doit pas, je pense, être sous-estimé, car il se rattache à un ensemble d'observations qui deviennent possibles en augmentant la concentration du substrat. Des aspects nucléolaires analogues se manifestent dans les stades II du rat, où je viens de les décrire (1964).

RÉSUMÉ

Des oocytes, des œufs vierges et mûrs, des œufs fécondés et des stades II ont été, dans des conditions toujours comparables, fixés

au formol, lavés et incubés en présence de certains mononucléotides: ATP, ADP, UTP, TTP, TDP. Les sites de déphosphorylation ont été décelés sous la forme de PbS.

L'activité enzymatique relative est plus forte dans l'œuf vierge et mûr que dans l'oocyte encore au repos.

Cette même activité s'élève à mesure que l'on approche de la neutralité, et plus encore quand on dépasse celle-ci. Cependant, l'enzyme sulcale se manifeste à un pH plus bas que ne le font les granules cytoplasmiques.

Qualitativement, les aspects obtenus après incubation dans les esters de la thymidine ne diffèrent pas de ceux obtenus avec d'autres tri- ou diphosphates. Cependant, la réaction paraît plus énergique.

La réaction du cytoplasme est due à un résidu éventuel d'activité mitochondriale, à des déphosphosomes isolés et en petits groupes, à de puissants amas de ces corpuscules. La réactivité relative de ces amas est plus faible que celle des déphosphosomes isolés ou modérément groupés.

Dans les conditions de ces expériences, une activité nucléaire ne s'est manifestée que dans la tache germinative des oocytes, dans certaines conditions. D'autres conditions d'expériences amplifient ces constatations et soulèvent un problème d'interprétation dont la discussion a trouvé place dans un mémoire consacré aux mêmes stades précoces du rat (1964).

SUMMARY

Oocytes, unfertilized mature eggs, fertilized eggs and stage II eggs have been, under exactly comparable conditions, fixed in formol, washed and incubated with the following mononucleotides- ATP, ADP, UTP, TTP, TDP. The sites of dephosphorylation have been revealed in the form of PbS.

The relative enzymic activity is greater in the unfertilized mature egg than in the quiescent oocyte.

This activity increases proportionally on approaching neutrality and beyond. However the furrow enzyme becomes manifest at a pH lower than even the cytoplasmic granules.

Qualitatively, the images obtained with incubation in the thymidine-esters do not differ from those obtained with the other tri- or diphosphates. However the reaction appears more intense.

The cytoplasmic reaction is due to a possible residual activity in the mitochondria, to dephosphosomes single and in small groups and to larger masses of these particles. The relative reactivity of these larger masses is weaker than that of single or small groups of dephosphosomes.

In these experimental conditions, nuclear activity is manifest only in the nucleolus of the oocyte under certain conditions. Other experimental conditions amplify and develop these observations and raise a problem of interpretation, the discussion of which will be found in a paper dedicated to the same early stages in the rat (1964).

ZUSAMMENFASSUNG

Oozyten (unreife und reife), befruchtete Eier und Zwei-Zellen Stadien wurden, immer under vergleichbaren Bedingungen, Formalin-fixiert, gewaschen und in Lösungen einiger Mononucleotiden (ATP, ADP, UTP, TTP, TDP) inkubiert. Die Schauplätze der Dephosphorylierung wurden mittelst der PbS-Technik determiniert.

Die relative enzymatische Aktivität ist stärker im reifen aber unbefruchteten Ei als in dem ruhenden Oozyten.

Diese selbe Aktivität wächst wenn das pH zur Neutralität ansteigt und noch mehr, wenn es die Neutralität überschreitet. Jedoch wird das Enzym der Furchen bei einem niedrigeren pH aktiv als die zytoplasmatischen Granula.

Die Bilder, die man nach der Inkubation in Thymidin-Estern beobachten kann, sind qualitativ nicht verschieden von denen, die man mit anderen Di- oder Tri-phosphaten erhält. Jedoch ist die Reaktion etwa stärker. Die Reaktion im Zytoplasma ist durch eine etwaige residuelle Aktivität der Mitochondria, durch Dephosphosomen, sei es isolierte oder in begrenzten Gruppen vereinigte, und auch durch wahre Ballen von diesen Körperchen verursacht. Die relative Reaktivität dieser Granula-Ballen ist immer schwächer als die der einzelnen oder in kleineren Gruppen auftretenden Dephosphosomen.

Während dieser Experimente, wurde eine Aktivität im Kern nur im Keimfleck der Oozyten, und nur unter gewissen Bedingungen, beobachtet. Andere Experimente zeigen ähnliche Ergebnisse für Stadien der Teilung; ihre Deutung wird in einer Arbeit über die selben frühen Stadien bei der Ratte (1964) diskutiert.

TRAVAUX CITÉS

Bankowski, Z. et Vorbrodt, A. 1962. *Recherches histochimiques sur l'activité des enzymes hydrolysant l'acide adénosinotriphosphorique, l'acide adénosinemonophosphorique et le glycérophosphate dans les noyaux cellulaires du foie et du thymus du rat.* Ann. Histochim., 7: 31-42.

Barden, H. et Lazarus, S. S. 1963. *Histochemical characteristics of adenosine triphosphate dephosphorylating enzymes in rabbit pancreas.* J. Histochem. Cytochem., 11: 578-589.

Bradshaw, M., Wachstein, M., Spence, J. et Elias, J. M. 1963. *Adenosine triphosphatase activity in melanocytes and epidermal cells of human skin.* J. Histochem. Cytochem., 11: 465-473.

Dalcq, A. M. 1959. *La localisation cytochimique de l'adénosinetriphosphatase dans les œufs des mammifères et sa relation avec leur organisation morphogénétique.* Bull. Acad. Roy. Méd. Belg., 6e Sér. 24: 825-901.

— 1961. *Les localisations des sites de déphosphorylation dans l'œuf de quelques mammifères et dans ceux d'un lamellibranche.* Bull. Soc. Zool. France, 86: 437-459.

— 1962a. *Les aspects du précipité argentique observés après application de la méthode de v. Kossa-Barger à des œufs de souris, fixés et incubés dans l'ATP (avec un amendement à la méthode argentique).* Histochemie, 2: 402-422.

— 1962b. *Etudes cyto-enzymologiques sur les œufs vivants de souris incubés en présence d'ATP et d'autres mononucléotides.* Arch. Biologie (Liège), 73: 405-444.

— 1962c. *Localisation et évolution des phosphatases aux premiers stades du développement.* Bull. Acad. Méd. Belg., 7e Sér., 2: 573-614.

— 1963. *The relation to the lysosomes of the in vivo metachromatic granules in.* Ciba Foundation Symposium on Lysosomes, 226-263. Edit. A. R. V. de Reuck and Margar. Cameron; Churchill, London.

— 1964. *Informations complémentaires sur les sites de déphosphorylation de mononucléotides dans les œufs fixés du rat.* Arch. Biologie (Liège), 75: 253-280.

GOLARZ, N. and BOURNE, G. H. 1961. *Induction and accentuation of phosphatase activity in the nucleoli of muscle nuclei by denervation and injected nucleotides.* Exp. Cell Res., 25: 691-693.

TEWARI, H. B. and BOURNE, G. H. 1963. *Histochemical studies on the distribution of adenosine triphosphatase in the trigeminal ganglion cells of the rat.* J. Histochem. Cytochem., 11: 511-519.

TORACK, R. M. and BARRNETT, R. J. 1963. *Nucleoside phosphatase activity in membranous fine structures of neurons and glia.* J. Histochem. Cytochem., 11: 763-772.

WACHSTEIN, M., MEISEL, E. et NIEDZWIEDZ, A. 1960. *Histochemical demonstration of mitochondrial ATP-ase with the lead-adenosine triphosphate technique.* J. Histochem. Cytochem., 8: 387-388.

EXPLICATION DES PLANCHES

PLANCHE I

FIG. 1 et 2.

S. 700. Comparaison entre un oocyte au repos (fig. 1) et un oocyte de 2e ordre (fig. 2). Cas de l'IDP

FIG. 3 à 5.

S. 710-711. Œufs fécondés et stade II incubés dans l'ATP au pH 6.3.

FIG. 6.

S. 714. Œuf encore en maturation, avec réaction discrète, mais avérée des fibres fusoriales *(flèche)*, après incubation dans l'ATP

FIG. 7.

S. 714. Réaction de fécondation mise en évidence par l'ATP. *a*, Vue générale de l'œuf, avec tout le trajet du spermatozoïde *(4 flèches)* et la réaction près de sa tête *(demi-cercle)*; on devine les alvéoles corticaux et des endroits où leur matériel franchit le plasmolemme. *b*, Plan optique légèrement différent qui montre la partie non engagée du flagelle *(flèche)* et les DPS positifs surmontant le noyau spermatique *(seconde flèche)*. — N.B.: La figure *a* a, par erreur, subi une rotation de 90° par rapport à la figure *b*.

FIG. 8.

S. 729-730. Oocyte incubé 2 h 30 min dans le TTP; examen retardé; *a*, en éclairage ordinaire; *b*, en Cph; 2 flèches pointent vers des granules accompagnés d'une vésicule claire.

FIG. 9.

Mêmes ♀. Œuf fécondé traité avec l'oocyte précédent; *a*, éclairage ordinaire; *b*, Cph.

PLANCHE II

Fig. 10.

Mêmes ♀. Autre œuf fécondé, également incubé dans le TTP. *a*, en éclairage ordinaire, avec *flèche* sur le principal amas de DPS; *b*, en Cph.

Fig. 11.

Mêmes ♀. Un oocyte et un œuf fécondé incubés 3 h 30 min dans le TTP. Examen retardé; éclairage ordinaire.

Fig. 12.

Mêmes ♀. Oocyte incubé 3 h 30 min dans le TTP. *a*, en éclairage direct, avec *flèches* sur deux amas de DPS; *b*, Cph, avec flèches sur les amas, mieux perceptibles, de DPS; *c*, en FN (Heine).

Fig. 13.

Mêmes ♀. Œuf fécondé et incubé dans le même milieu; *a*, en éclairage direct; *b*, en FN au même niveau optique. *Flèches* sur trois des amas de DPS.

Fig. 14.

Mêmes ♀. Œuf fécondé incubé dans l'ATP pendant 2 h 30 min. *a*, vue générale; *b*, détail des granules en Cph. Les *flèches* indiquent des groupes de DPS.

Fig. 15.

S. 727-728. Œufs fécondés et stades II préalablement centrifugés et incubés ensemble dans le TTP.

Fig. 16.

Mêmes ♀. Autre comparaison entre un œuf indivis et un stade II, tous deux centrifugés et incubés ensemble dans le TTP; tassement net des granules dans l'œuf indivis, non perceptible, dans le stade II (orientation ?) où se montre une puissante réaction sulcale débordant vers les globules polaires.

PLANCHE III

Fig. 17.

Mêmes ♀. Stades I centrifugés et incubés; *a*, dans le TTP; *b*, dans l'ATP. Les *flèches* indiquent la direction centrifuge.

Fig. 18.

Mêmes ♀. Oocyte incubé dans ATP. *a*, *b*, *c*, trois niveaux optiques de plus en plus profonds, Cph; en *a*, *flèches* sur deux empreintes choriales de cellules folliculeuses et d'autre part garniture corticale de grains de divers calibres.

Fig. 19.

S. 731 à 734. Incubation prolongée 3 h 30 min dans le TTP au pH 6.3. En haut, craquelure accidentelle dans la membrane.

Fig. 20.

Mêmes ♀. Autre œuf, en Cph.

Fig. 21.

Mêmes ♀. Trois des œufs incubés dans le TTP au pH 7.5, *a* et *b* Cph; *c* = FN (Heine).

Fig. 22.

Mêmes ♀. Incubation dans le TDP au pH 7.5. Cph.